

### **Отзыв официального оппонента**

Доктора биологических наук, профессора Киселёва Сергея Львовича, заведующего лабораторией эпигенетики ФГБУН ИОГен РАН на диссертационную работу Мисюрина Всеволода Андреевича по теме «PRAME – драйверный белок канцерогенеза и мишень противоопухолевой терапии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия.

Новые технологии секвенирования следующего поколения позволили обнаружить тысячи мутаций, как в отдельных образцах, так и в больших группах опухолевой ткани. Однако не все мутации в опухолевой ткани способствуют инициации или прогрессированию злокачественных новообразований, так как исходные мутации и вызванные ими процессы влияют на клеточные функции, выходящие за рамки тех, которые имеют отношение к развитию опухоли. Определение того, какие мутации способствуют возникновению опухоли и ее прогрессии, является ключевым шагом в понимании биологии опухоли и разработке таргетной терапии. Мутации, обеспечивающие избирательное преимущество в росте и, таким образом, способствуют развитию рака, называются драйверными мутациями. Точная идентификация всех генов-драйверов рака у отдельных пациентов вызывает все больший интерес для использования этого в таргетной индивидуальной терапии. Основной подход по определению генов-кандидатов в качестве драйверов основан на генах мутировавших в большинстве образцов опухолевой ткани. Другой подход по определению драйверных генов и их мутаций основан на большем влиянии на функцию белка, чем это могут оказывать мутации-пассажиры. Функциональное воздействие мутации на драйверный ген может быть оценено на основе эволюционной консервативности, влиянии на вторичные и третичные особенности строения белка и т.д.

В отличие от подходов определения драйверных генов, основанных на частоте, подходы, основанные на функциях белковых вариантов, могут идентифицировать потенциального драйвера на основе анализа функционального взаимодействия белковых вариантов всего из одного образца. Таким образом, определение новых драйверных генов, опираясь на один или другой подход, является важной задачей современной противоопухолевой медицины, позволяющей предложить новые способы воздействия на опухолевый процесс. Таким образом, тематика диссертационного исследования «PRAME – драйверный белок канцерогенеза и мишень противоопухолевой терапии» является актуальной и важной, как в плане выяснения фундаментальных механизмов, так и практического использования результатов исследования.

Диссертационная работа В.А. Мисюрина построена по традиционной схеме и состоит из основных разделов, включающих введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы.

Обзор литературы состоит из трех идеологических разделов, посвященных описанию гена и белка PRAME и их гомологам, участию PRAME в опухолевых процессах различной этиологии и его диагностическо-прогностической роли, и возможности использования PRAME как мишени для проведения противоопухолевой терапии. PRAME расположен на 22 хромосоме. Ген PRAME человека имеет множество паралогов, находящихся на X хромосоме и псевдогенов. Ген PRAME и его паралоги обнаружены не только у человека, но и других млекопитающих, что облегчает его изучение. Экспрессия гена специфична для тканей полового пути и опухолей, поэтому экспрессионный профиль определяет его как раково-тестикулярный антиген. Автор отмечает, что с гена транскрибируется около полутора десятков сплайс-вариантов, некоторые из которых могут кодировать белок. Полноразмерный транскрипт кодирует белок, содержащий девять лейцин-богатых (LLR) мотивов, между первым и вторым мотивом расположен сигнал ядерной локализации. Белок PRAME человека способен ассоциироваться с гистоновыми белками и с метилтрансферазой гистонов EZH2, таким образом, вероятно, играя роль в эпигенетической регуляции других генов. Диссертант демонстрирует, что эффекты вызываемые гиперэкспрессией PRAME, приводят к трансформации клеток. Они приобретают самостоятельность в пролиферативных сигналах, приобретают нечувствительность к рост-ингибирующим сигналам, происходит активация генов, ответственных за активный метаболизм и проонкогенные сигнальные пути, происходят эпигенетические изменения и ослабление индукции апоптоза, клетки приобретают способность к инвазии. Клинически, повышенная экспрессия PRAME связана с химиорезистентностью и метастазированием опухоли при раке яичника, молочной железы, почки, меланоме и множестве других онкологических заболеваний. При меланоме и раке молочной железы гиперэкспрессия PRAME не ассоциирована со стадией заболевания, но значительно ухудшает прогноз. Большое разнообразие иммуногенных эпитопов PRAME делает этот белок очень привлекательным для терапии. Одним из вариантов является амплификация Т-лимфоцитов, распознающие пептиды PRAME, однако технологическая сложность наработки Т-лимфоцитов *in vitro* делает привлекательным способ вакцинирование больных пептидами или белком PRAME для активации иммунного ответа, хотя ни один из испытанных способов вакцинирования еще не доказал полностью свою эффективность. В целом, из обзора литературы диссертант

делает вывод, что PRAME может быть драйвером онкогенеза и ставит задачу по проведению исследования для доказательства этого предположения.

В целом, обзор литературы написан ясным и понятным языком, логично построен и основываясь на самых современных данных, вводит в курс проблемы и четко определяет цели и задачи исследования.

Раздел диссертационной работы Материалы и методы исследований включает описание, как биоинформационных подходов, так и экспериментальных методов. В целом раздел написан понятно и подробно. Однако, когда знакомишься с разделом результаты, становится понятно, что описание многих методов отсутствует. Так в разделе результаты приводятся данные по пролиферации, микрочипам, трансфекции клеток, проточной цитометрии, использование xCELLigence и другие, но в разделе методов полностью отсутствует информация о том, как эти методики применялись, какие приборы и реактивы использовались, как проводилась обработка полученных данных.

Глава 3 диссертационной работы посвящена представлению полученных экспериментальных результатов. В первом разделе диссертант проводит биоинформационный анализ гена PRAME и его семейства, а также анализ возможных белковых вариантов продукта трансляции. Делается вывод, что на основе 3d-моделирования изоформа в 509 ак, скорее всего не может участвовать в убиквитинировании, так как белок такого размера просто не помещается в комплекс CUL2. Предсказано наличие ещё одной группы генов, гомологичных PRAME высших обезьян, PRAME-PRIM. Следующий раздел главы посвящен экспериментальным исследованиям *in vitro*. Показано, что экзогенная гиперэкспрессия PRAME в нормальных диплоидных фибробластах увеличивает скорость пролиферации, придаёт им способность к росту в бессывороточной среде, а также обеспечивает повышенную резистентности к различным химиопрепаратам. Это свидетельствует в пользу предположения диссертанта о трансформирующем потенциале гена. В следующем разделе диссертант изучает возможные механизмы регуляции гена PRAME в опухолевых клетках. На модели различных клеточных линий меланомы была обнаружена корреляция экспрессии гена PHF8, вовлеченного в деметилирование гистонов, и гена PRAME. Было сделано предположение, что PHF8 может быть эпигенетическим регулятором экспрессии гена PRAME. Используя метод РНК интерференции, диссертант продемонстрировал правильность сделанного предположения и показал, что этот подход может быть использован на практике, так как при этом увеличивалась чувствительность этих клеток к цисплатину. Другим таргетным подходом для опухолей экспрессирующих PRAME является воздействие не на уровне мРНК гена, а на блокирование функций белка PRAME.

В частности, на функцию убиквитинилирования и протеасомной деградации белков. Протеасомный ингибитор бортезомиб усиливал цитотоксическое действие цисплатина, доксорубицина, мелфалана и других в PRAME-гиперэкспрессирующих клеток меланомы, рака молочной железы и других. При этом действие имело обратную корреляцию с уровнем экспрессии. В опухолевых линиях со сниженной экспрессией PRAME цитотоксичности не наблюдалось. Диссертант не ограничился только этими подходами по повышению эффективности противоопухолевой терапии при PRAME позитивных опухолях и изучил возможность блокировать драйверные свойства белка PRAME *in vivo* с помощью антиген- специфических антител. С участием диссертанта были получены два моноклона, которые в проведенных им экспериментах на ксенографтах гиперэкспрессирующих PRAME у иммунодефицитных мышей показали значительное торможение роста опухоли. Учитывая, что как было показано диссертантом, гиперэкспрессия PRAME является негативным прогностическим фактором, использование этой разработки может иметь значительное клиническое значение. К сожалению, диссертант не определил на какие именно эпитопы PRAME ориентированы моноклоны, что дало бы значимую информацию о возможных молекулярных свойствах PRAME как драйвера опухолевого процесса. Однако, это совершенно не снижает ценность полученных данных. В целом представлены убедительные данные, подтверждающие предположения автора. В тоже время, глава не лишена некоторых неточностей и недостатков. Так, проводя биоинформационный анализ структуры PRAME, диссертант упоминает, что геномный локус на 3' конце содержит гены транскрипционных факторов ZNF280a,b (стр 84). На сегодняшний момент об этих генах известно, что они кодируют белки типа цинковых пальцев, которые могут связываться с ДНК, но точные функции, в том числе и как транскрипционного фактора неизвестны. Текст на стр 86 1й параграф полностью продублирован во 2й параграф. Сходная неаккуратность на стр. 88, где написано «Эта РНК древняя, и обнаруживается в геноме многих организмов, в том числе рыб.» Несомненно, смысл фразы понятен, но если быть корректным, то РНК древней быть не может, время полураспада РНК часы, а вот, ген который ее кодирует действительно древний. Как уже упоминалось выше, не представлены многие экспериментальные методы, что затрудняет прочтение материала. Не очень убедительно звучит заключение автора на стр. 98 «WI-38-PRAME выживали в статистически значимо большем числе по сравнению с клетками WI-38, и формировали колонии (Рисунки 21-24).», так как изначально клеток WI-38-PRAME было больше.

В главе 4 диссертантом обсуждаются полученные экспериментальные данные, подтверждающие наличие драйверных свойств у гена *PRAME*. Им предлагается схема

возможных путей гиперэксперссии гена и указываются возможные направления таргетной терапии. На основании проанализированных клинических данных определяются более точно группы риска при опухолевых заболеваниях, у которых рекомендуется производить измерение уровня экспрессии гена PRAME для прогноза течения. Предложенные в диссертационном исследовании новые подходы по таргетированию РНК гена или кодируемого им белка, непосредственно или влияя на его функциональные свойства, несомненно, могут иметь практическое значение. В целом раздел обсуждения написан логично и обосновано. На основании этого раздела диссертантом сформулировано заключение, а выводы следуют из экспериментальных данных, полученных в ходе проведения исследования.

В целом, сделанные Всеволодом Андреевичем выводы целиком основаны на полученных данных. Автором проделана большая экспериментальная работа, разработаны оригинальные модельные системы, получены принципиально новые результаты, определяющие новое направление в науке и имеющие практическую значимость. Полученные экспериментальные и теоретические данные имеют важное фундаментальное и прикладное значение и могут быть использованы целым рядом медицинских и научных организаций, таких как НИИ онкологии им. Петрова, МНИОИ им. Герцена, в других профильных медицинских организациях, а также в научно-исследовательских институтах Российской Федерации.

Результаты работы В.А. Мисюрина опубликованы в ведущих отечественных и международных научных изданиях. Опубликованные статьи и тезисы говорят об авторском вкладе в проведенные исследования, полностью отражают содержание диссертации, а выводы соответствуют полученным данным. Автореферат отражает содержание диссертации и соответствует материалам, изложенным в диссертационной работе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все вышеизложенное позволяет утверждать, что диссертация Мисюрина Всеволода Андреевича на тему «PRAME – драйверный белок канцерогенеза и мишень противоопухолевой терапии, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия является законченным самостоятельным научным исследованием, в котором проведено исследование влияния гена PRAME на опухолевый фенотип клетки и предложены новые способы лечения PRAME-экспрессирующих опухолей. По своей актуальности, уровню и объему проведенных исследований, научной новизне полученных результатов и их

практической значимости, способу решения поставленных задач диссертационная работа Мисюрин В.А. соответствует всем требованиям соответствующим требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Правительством Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168, от 20 марта 2021 года №426), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а соискатель Мисюрин Всеволод Андреевич достоин присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия.

Главный научный сотрудник лаборатории эпигенетики

Заведующий лабораторией эпигенетики

ФГБУН ИОГен РАН,

Доктор биологических наук,

профессор

Сергей Львович Киселев

*14. 02. 2022*

Подпись д.б.н., профессора С.Л. Киселёва заверяю,

Ученый секретарь

ФГБУН ИОГен РАН,

Доктор биологических наук,

профессор



Серикбай Каримович Абилов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62

Почтовый адрес (официальный): 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3

Email: iogen(at)vigg.ru